

**O EXTRATO ETANÓLICO DA PLANTA MEDICINAL *COMBRETUM LEPROSUM*
PREVINE DÉFICITS COGNITIVOS EM UM MODELO MURINO DE ISQUEMIA
CEREBRAL GLOBAL**

GLENDIA GOMES FERREIRA

**Dissertação de Mestrado em Bioquímica e Farmacologia
(Formato de apresentação de artigo)**

Universidade Federal do Espírito Santo

**VITÓRIA
2019**

GLENDAGOMES FERREIRA

**O EXTRATO ETANÓLICO DA PLANTA MEDICINAL *COMBRETUM LEPROSUM*
PREVINE DÉFICITS COGNITIVOS EM UM MODELO MURINO DE ISQUEMIA
CEREBRAL GLOBAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientador: Prof.^a Dra. Cristina Martins e Silva

Coorientador: Dra Rita Gomes Wanderley Pires.

VITÓRIA

2019

ESPAÇO PARA ATA DE DEFESA

Espaço reservado aos dados internacionais de catalogação, elaborados pela Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo.

RESUMO

O acidente vascular encefálico (AVE) está descrito entre as maiores causas de morte no mundo de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS). O AVE é subdividido em isquêmico (AVEi) e hemorrágico (AVEh), sendo o primeiro mais prevalente. A interrupção de sangue em uma determinada região do cérebro no AVEi cria duas regiões distintas no tecido: o “núcleo isquêmico” e a “penumbra isquêmica”. As células do núcleo isquêmico morrem primariamente por necrose pela falta direta de suprimentos básicos para a sobrevivência celular, enquanto as células da região de penumbra morrem por apoptose, sendo essa região factível de intervenção. O principal tratamento farmacológico disponível hoje envolve o uso do medicamento Alteplase, um trombolítico cuja utilização é extremamente restrita. Nesse sentido, novas abordagens são necessárias a fim de ampliar o espectro terapêutico, além de reduzir os efeitos colaterais. E é nessa perspectiva que as plantas medicinais da flora brasileira são uma potente fonte para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento do AVEi. De todo o exposto acima, nosso trabalho avaliou o possível efeito do tratamento com o extrato etanólico da planta medicina *Combretum leprosum* (EECL) em prevenir os danos celulares e cognitivos causados por AVEi em camundongos. Para isto, utilizamos camundongos machos da espécie *Mus musculus* e linhagem Swiss, 8-10 semanas (CEUA 53/2017 – UFES), os quais foram submetidos a um modelo de isquemia global/reperfusão (BCCAO) e tratados oralmente com EECL na dose de 100mg/kg. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: sham veículo (salina+tween20) (SV), sham extrato (salina+tween 20 + EECL) (SE), isquemia veículo (IV) e isquemia extrato (IE). Após recuperação anestésica, os animais receberam duas doses de EECL ou veículo com intervalo de 3 horas entre as doses e esse regime foi repetido 24hs depois. Posteriormente, a dose passou a ser única até o final dos experimentos. A quantificação da área de infarto demonstrou uma redução da área isquêmica em de 33%. O tratamento também demonstrou uma diminuição significativa nos déficits cognitivos relacionados a memória espacial e de reconhecimento de objeto. A melhora encontrada no tratamento do AVEi está possivelmente relacionada ao aumento de células imunopositivas para o marcador neuronal NeuN no ensaio Imunofluorescência em animais do grupo IE, bem como a diminuição da expressão do marcador de astrócitos ativados GFAP nesse mesmo grupo. Dessa forma, nosso estudo traz evidências promissoras da utilização do EECL no tratamento do AVEi.

Palavras chaves: Extrato etanólico de *Combretutum Leprosum*, isquemia cerebral, aprendizagem e memória, comportamento cognitivo.

ABSTRACT

Stroke (AVE) is described as one of the main causes of death according to the World Health Organization (WHO). The AVE is subdivided into ischemic (AVEi) and hemorrhagic (AVEh), the first being more prevalent. The interruption of blood in a particular region of the brain in the AVEi creates two distinct regions in the tissue: the "ischemic nucleus" and the "ischemic penumbra". The cells of the ischemic nucleus are first affected from necrosis due to the direct lack of basic supplies for the cell survival, while cells in the penumbra region die from apoptosis, being this region feasible of intervention. Currently, the main pharmacological therapeutic approach involves the use of Alteplase, a thrombolytic drug that is extremely restricted. Thus, new approaches are needed to therapeutic spectrum, in addition to reducing the side effects. To this end, medicinal plants of the Brazilian flora are a powerful source for the development of medicines for the treatment of stroke. Given the above, our work evaluated the possible effect of the treatment with the ethanolic extract of the medicine plant *Combretum leprosum* (EECL) in preventing cellular and cognitive damage caused by AVEi in mice. Herein, in the present study, we used male mice of the *Mus species musculus* and Swiss lineage, 8-10 weeks (CEUA 53/2017 - UFES), which were submitted to a global ischemia / reperfusion (BCCAo) model and treated orally with EECL at the dose of 100mg / kg. The animals were randomly divided into four experimental groups: vehicle sham (saline + tween20) (SV), sham extract (saline + tween 20 + EECL) (SE), vehicle ischemia (IV) and ischemia extract (IE). After anesthesia recovery, the animals received two doses of EECL or vehicle at intervals of 3 hours between doses and this regimen was repeated 24 hours later. Subsequently, the dose became unique until the end of the experiments. The quantification of the infarct area showed a reduction of the ischemic area by 33%. Additionally, our data shows that the treatment decrease the cognitive deficits related to spatial memory and object recognition. The improvement found in the treatment of AVEi is possibly related to the increase of cells immunopositive for the neuronal marker NeuN in the Immunofluorescence assay in animals of the IE group, as well as the decrease of the expression of the marker of activated astrocytes GFAP in the same group. Overall, this report provides promising evidence of the potencial use of EECL in the treatment of stroke.

Key words: Ethanolic extract of *Cobretutum Leprosum*, cerebral ischemia, learning and memory, cognitive behavior

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Neuroquímica e Comportamento do Departamento de Ciências Fisiológicas, no Centro de Ciências da Saúde na Universidade Federal do Espírito Santo, com auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES)**
- Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES)**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado a cada passo que dou e me conceder a dádiva de estar cursando algo que tanto desejei;

Aos meus pais, os principais colaboradores para minha chegada até aqui;

A minha filha Sophia, por entender que a mamãe por muitas vezes precisou se ausentar;

Ao meu marido Marcelo que por vezes me acompanhou nos dias de experimento e em outros, com paciência e compreensão me esperou chegar em casa;

A minha coorientadora Rita, por ter me dado inicialmente a oportunidade de ingressar em seu laboratório;

A minha querida orientadora, que não só me ensinou a fazer pesquisa, mas também me mostrou a ter maturidade diante as adversidades. Não existem palavras suficientes pra agradecer a confiança, paciência e cuidados;

Aos meus colegas de laboratório em especial Natalie, Rafael, Tamara, Sarah, Emanuel, Debora e Matheus. Obrigada pela paciência, ombro amigo e aprendizado;

Aos colegas de turma, Rafael, Ana Maria e Lara por compartilharem o conhecimento de vocês;

À FAPES e CAPES, pelo apoio financeiro;

Ao Laboratório de Histologia Molecular e Imunohistoquímica (LHMI) pela utilização dos equipamentos e a todo o corpo técnico do Centro de Ciências da Saúde da UFES, por toda ajuda sempre que necessária;

A todos que me apoiaram e contribuíram para que eu chegasse ao fim dessa etapa.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
AVE	Acidente Vascular Encefálico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
Ca ²⁺	Íon cálcio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
Glu	Glutamato
iGluRs	Receptores glutamatérgicos ionotrópicos
IL-1 β	Interleucina 1 beta
K ⁺	Íon potássio
KA	Cainato
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptor N-metil-D-aspartato
SNC	Sistema nervoso central
CL	<i>Cobretum Leprosum</i>
EECL	Extrato etanólico de <i>Combretum Leprosum</i>
EROS	Espécies reativas de oxigênio
BCCAo	Oclusão bilateral das carótidas comum
STM	Memória de curta duração
MWM	Labirinto Aquático de Morris
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO	13
1.2 FISIOPATOLOGIA DO AVE	13
1.3 DIAGNOSTICO E TRATAMENTO	18
1.4 PLANTAS MEDICINAIS NA TERAPÊUTICA DO AVE	19
2 JUSTIFICATIVA	23
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
O extrato etanólico da planta medicinal <i>combretum leprosum</i> previne déficits cognitivos em um modelo murino de isquemia cerebral global	25

1 INTRODUÇÃO

1.1 ACIDENTE VASCULAR ENCEFÁLICO

O Acidente Vascular Encefálico (AVE) é uma patologia grave e frequente, definida a partir de uma anormalidade na irrigação sanguínea (SINGH et al., 2017), que pode ser a partir da redução ou até mesmo impedimento do fluxo sanguíneo em uma determinada região cerebral (CHEN et al., 2017).

Subdividido em hemorrágico (AVEh) ou isquêmico (AVEi), o primeiro é desencadeado pelo rompimento de vasos sanguíneos, enquanto o segundo, com prevalência de 80% dos casos, ocorre devido a obstrução de uma ou mais artérias cerebrais (JIANG, et al., 2018).

Sua causa principal assim como a maioria das doenças cerebrovasculares, pode ser atribuída a diversos fatores, dentre eles a aterosclerose e a hipertensão, em que esta última é a principal responsável pelo AVEi (SHINODA, N. et al., 2017). Outros fatores como a inatividade física, dislipidemia, obesidade e má distribuição de gordura corporal, *diabetes mellitus*, tabagismo e fibrilação atrial potencializam a ocorrência desta enfermidade (DI LEGGE et al., 2012), entretanto o tratamento do diabetes e hipertensão, associado ao controle dos demais fatores de risco contribuem significativamente para a diminuição da mortalidade e consequentemente incapacitação (GO et al., 2013).

Um indivíduo afetado por um AVEi pode sofrer diversas complicações, tais como: dificuldades na fala e alimentação; constipação ; epilepsia; depressão; fraqueza ou formigamento na face, no braço ou na perna; confusão mental; alteração na visão; alteração do equilíbrio, coordenação; tontura ou alteração no andar; dor de cabeça súbita intensa; déficits na memória espacial, no processamento de informações entre outras (FAIZ et al., 2018).

1.2 FISIOPATOLOGIA DO AVE: ISQUEMIA E REPERFUSÃO

A isquemia é definida como o processo em que existe ausência ou deficiência do aporte sanguíneo em um tecido, o que consequentemente diminui o aporte de oxigênio e glicose. Por outro lado, a reperfusão é o processo de restabelecimento sanguíneo após a isquemia (HARUKUNI; BHARDWAJ, 2006) e o dano que ocorre posteriormente à reperfusão da região isquemiada é denominado lesão isquemia/reperfusão (I/R) (HARUKUNI; BHARDWAJ, 2006).

O cérebro submetido a um evento isquêmico apresenta duas regiões morfológicamente distintas: núcleo e penumbra (APPIREDDY et al., 2015).

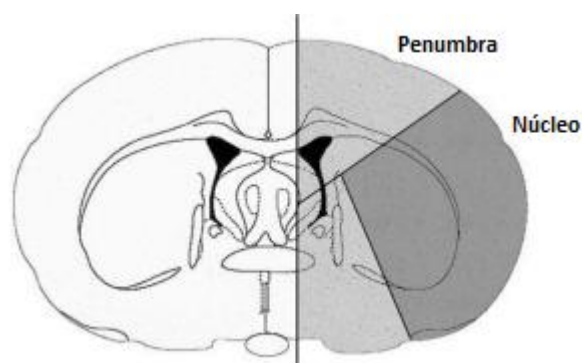


Fig. 1. Desenho esquemático das regiões do núcleo e da penumbra isquêmica (Adaptado de BONOVA et al., 2012).

A região do núcleo desenvolve-se a partir da ausência severa do fluxo sanguíneo no tecido cerebral, o que consequentemente pode resultar uma necrose. Por outro lado, a região de penumbra é adjacente ao núcleo isquêmico, sendo esta, irrigada pela vascularização colateral do tecido e é onde as intervenções farmacológicas têm maior probabilidade de sucesso (FISHER; BASTAN, 2012). Ainda nesta região cerebral, o fluxo sanguíneo está abaixo da demanda metabólica normal, sendo o metabolismo energético mantido a um nível baixo, permitindo uma sobrevivência das células na área. Entretanto, com a precariedade de substratos importantes para a manutenção da função celular, pode-se ter uma transformação da área de penumbra em tecido necrótico (W.-D., 2000).

1.3 INFLAMAÇÃO, ESTRESSE OXIDATIVO E EXCITOTOXICIDADE

Durante o evento isquêmico, o metabolismo anaeróbico prevalece, o que produz uma diminuição no pH celular. Para diminuir esse acúmulo de prótons H^+ , ocorre um grande influxo de íons de sódio. Há também uma perda da atividade neuronal a partir do efluxo de íons de K^+ mediada inicialmente pela abertura de canais voltagem-dependentes e na sequência por canais ATP-dependentes levando a uma hiperpolarização transitória da membrana plasmática. Em seguida, ocorre uma redistribuição iônica na membrana plasmática associada com a despolarização (efluxo de K^+ e influxo de Na^+ , Ca^{2+} e Cl^-) (JOHNSON, ONUMA, OWOLABI, & SACHDEV, 2016; KALOGERIS, BAINES, KRENZ, & KORTHUIS, 2012). A despolarização da membrana resulta na liberação excessiva de neurotransmissores, em especial de glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (LEWERENZ; MAHER, 2015; MAGI; PICCIRILLO; AMOROSO, 2019; SHINODA, Y. et al., 2016).

A rápida retirada de glutamato da sinapse por seus transportadores é essencial para a neurotransmissão excitatória natural. Esse mecanismo é extremamente importante para prevenir a excitotoxicidade desencadeada por esse neurotransmissor. Esse evento tóxico promove danos celulares graves e está envolvido em diversas doenças agudas e crônicas do sistema nervoso central (SNC). Entretanto, após um evento isquêmico, o influxo de cálcio e a estimulação de receptores de glutamato podem resultar em excessiva despolarização da membrana, que também pode ativar canais de cálcio dependentes de voltagem. Isso, por sua vez, permite um influxo ainda maior de cálcio, alimentando, assim, um ciclo vicioso que agrava a sobrecarga de cálcio intracelular e acelera a morte neuronal (MAGI; PICCIRILLO; AMOROSO, 2019). O aumento de cálcio também promove a ativação de diversas enzimas proteolíticas cálcio-dependentes, bem como proteínas da matriz extracelular e nucleases, o que leva ao desenvolvimento da injúria celular (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

Concomitantemente, o excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidos compromete o balanço oxidativo entre a formação e a neutralização por antioxidantes endógenos, provocando lise da membrana citoplasmática, danos maiores ao DNA, e conseqüentemente na morte celular (BARONE; FEUERSTEIN, 1999; DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

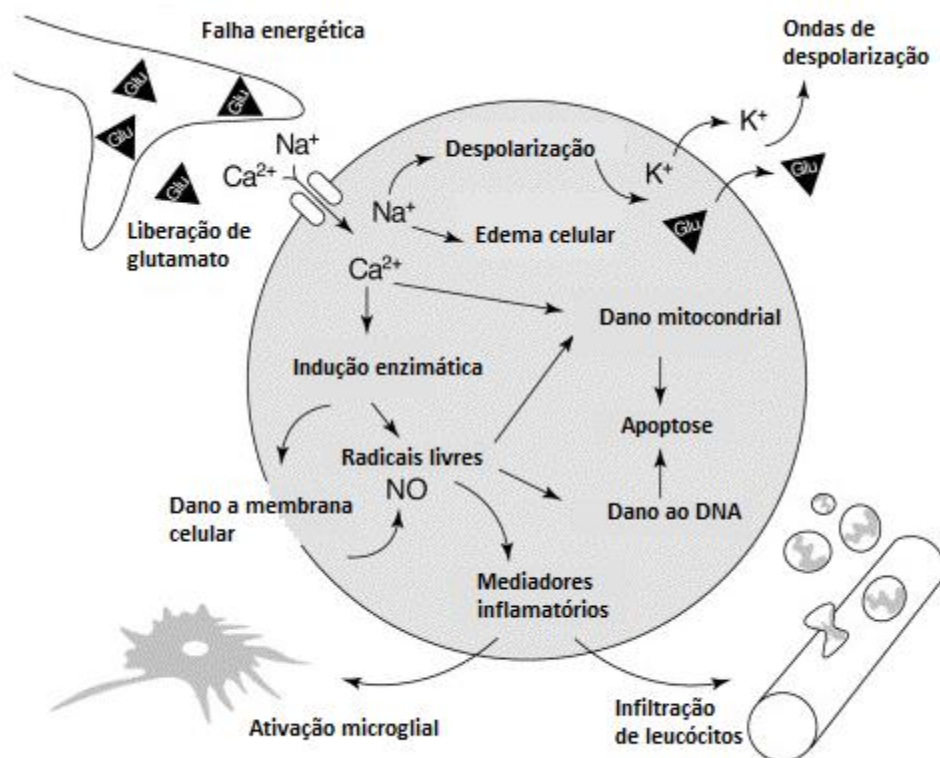


Fig. 2. Mecanismos fisiopatológicos durante a isquemia cerebral (adaptado de DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999)).

Após a ocorrência da lesão, uma inflamação é instalada e os neutrófilos são as primeiras células a invadir tecido após isquemia cerebral. Nestas condições, as suas propriedades pró-inflamatórias aumentam a lesão tecidual. Inicialmente essas células desempenham um papel de reparo tecidual, no entanto, seus efeitos prejudiciais dominam com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), e várias citocinas, ambos contribuintes para a ruptura da matriz extracelular (JICKLING et al., 2015; MORRISON; MCKEE; RITTER, 2011; RUHNAU et al., 2017).

Ainda com a inflamação, apesar da produção e consequentemente liberação de citocinas pró-inflamatórias, observa-se ativação de células incluindo neurônios, astrócitos, micróglia e células endoteliais resultando na morte de células gliais e neuronais durante a isquemia (DAVID et al., 2012).

Os astrócitos são uma importante célula do SNC que possuem diversas funções como regular a formação e a manutenção de sinapses, o fluxo sanguíneo cerebral

e a integridade da barreira hematoencefálica (CEKANAVICIUTE; BUCKWALTER, 2016). Além disso, essas células participam da transmissão glutamatérgica, na qual o glutamato é captado por transportadores de alta afinidade presentes nos astrócitos adjacentes à sinapse, evitando a permanência do neurotransmissor no espaço extracelular após a atividade neuronal, sobretudo após um trauma, a fim de prevenir a excitotoxicidade (MEDEROS; GONZÁLEZ-ARIAS; PEREA, 2018). (MEDEROS; GONZÁLEZ-ARIAS; PEREA, 2018).

Existe um crescente corpo de evidências de que os astrócitos são importantes reguladores *in situ* da resposta neuroinflamatória no AVE. Essas células são expressas em todo o cérebro adulto, entretanto com níveis mais altos no hipocampo e no neocórtex (YUAN et al., 2017). Durante a lesão do SNC, os astrócitos em seu ambiente extracelular e nas células às quais estão acoplados, alteram suas características morfológicas e funcionais para adotar um fenótipo "reativo". Sua reatividade ocorre no período subagudo de 2 dias a 1 semana após o AVE e com formação de uma cicatriz em torno do núcleo do AVE em 2 semanas (CEKANAVICIUTE; BUCKWALTER, 2016).

Já a micróglia congrega as principais células envolvidas na defesa contra danos cerebrais. Elas surgem no cérebro desde o início do desenvolvimento e persistem até a idade adulta e normalmente são responsáveis pela remoção de células neuronais mortas e pela restauração das funções neuronais. Após AVE, estas se apresentam de forma ativada, reagindo rapidamente a ameaças. O seu pico de ativação ocorre em 2 a 3 dias e permanece sustentado por várias semanas (KIM; CHO, 2016).

Além das células da glia que se apresentam pós isquemia, temos também como destaque enzimas e proteínas que estão envolvidas na inflamação. Como destaque, as enzimas pró-inflamatórias, incluindo ciclo-oxigenases (COX), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e NADPH oxidases (NOX) e as citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α (DAVID et al., 2012).

1.4 DIAGNOSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico do AVE é realizado por meio da avaliação do histórico do paciente e, principalmente, pela avaliação de sinais clínicos tais como: perda de força e sensibilidade, dificuldade visual e de fala, cefaleia intensa, desequilíbrio e tontura, simetria alterada no rosto (MESCHIA et al., 2014).

Como forma de tratamento, a revascularização do tecido (reperusão), é essencial, para minimizar a injúria ao tecido, porém após esse evento, ocorre ampliação das lesões produzidas na fase isquêmica isolada (KALOGERIS et al., 2012). A reperusão pode ocasionar efeitos deletérios como acentuar o edema tecidual, além de não promover uma restauração uniforme do fluxo sanguíneo para o tecido (DE GROOT; RAUEN, 2007).

Os dados estatísticos atuais demonstram claramente que o AVE é uma patologia que causa grande prejuízo ao indivíduo, seja ele social, financeiro, emocional. O principal tratamento fornecido ao paciente que entra em uma unidade de saúde com suspeita de um AVE é a revascularização do tecido com a utilização do trombolítico alteplase rtPA em até 4,5 horas do início dos sintomas (KNUTTINEN et al., 2010). O Ministério da Saúde brasileiro (2013) sugere que a terapia trombolítica seja iniciada nos primeiros noventa minutos após o início dos sintomas para que haja um melhor prognóstico.

O rt-PA apresenta eficácia comprovada pela Food and Drug Administration (FDA), no entanto, grande parte dos pacientes que chegam ao atendimento hospitalar não se enquadram para tratamento com essa droga. Médicos apresentam receio em utilizar este medicamento, pois muitas vezes não podem certificar que os pacientes estão dentro da janela terapêutica. Após 4,5hs os malefícios desse medicamento, devido aos efeitos colaterais, superam o benefício do tratamento. Estima-se que apenas 4% dos que procuram atendimento hospitalar estão dentro dessa janela (LEE; ZHANG; YU, 2017; MICIELI; PIERA; TOSI, 2009).

Outro fármaco recentemente utilizado em países asiáticos é o Edaravone. A edaravona é uma droga antioxidante, aprovada para uso no Japão, sendo utilizado no tratamento do AVEi dentro de 24 horas do início dos sintomas, o que já amplia o tempo de intervenção (NAGANUMA et al., 2018). Foi demonstrado que a droga

reduz o excesso de EROs(MATSUMOTO et al., 2018), prevenindo danos cerebrais, em pacientes com ELA (Esclerose Lateral Amiotrófica). Diante desse fato, atualmente ela tem sido recomendada nas diretrizes japonesas para o tratamento do AVE. Recentemente, a FDA também concedeu uma licença para o edaravone para o tratamento da esclerose lateral amiotrófica nos EUA (NAGANUMA et al., 2018; YAMAGUCHI et al., 2017; MATSUMOTO et al., 2018).

Até o momento, não existe tratamento eficaz para o comprometimento cognitivo pós-AVE (SUN; TAN; YU, 2014). Como alternativas, a utilização de fármacos inibidores da acetilcolinesterase, antagonistas de receptores N-metil-Daspartato (NMDA) e antidepressivos, convencionalmente utilizados no tratamento da Doença de Alzheimer, têm demonstrado pequenas melhorias no comprometimento cognitivo (GARDONI; DI LUCA, 2006; MALOUF; BIRKS, 2004). Contudo, estas drogas não melhoram os resultados no momento do evento clínico, sem levar em consideração também dos efeitos adversos e custos elevados (LEVINE; LANGA, 2011).

Julgando as limitações da terapêutica atualmente empregada, novas estratégias são necessárias para reduzir o dano cerebral e suas consequências, melhorando o prognóstico. Nesse contexto, outras terapias que podem ser alternativas, devem ser investigadas para auxiliar no tratamento, principalmente inibindo deficits motores e cognitivos advindos do comprometimento do sistema nervoso central após AVE.

1.4 PLANTAS MEDICINAIS NA TERAPÊUTICA DO AVE

A fitoterapia, ou seja, o uso de plantas medicinais no tratamento de diversas enfermidades, possui importante e preponderante papel na medicina popular (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012). Sua grande utilização está associada, primeiramente, aos avanços ocorridos na área científica, que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes. Segundamente, pela crescente utilização pela população em geral que opta por terapias menos agressivas e que acabam por acreditar que as plantas apresentam pouco ou nenhum efeito colateral (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012).

As etapas necessárias para utilização de uma planta como fitoterápico são a comprovação da sua eficácia e segurança através de ensaios farmacológicos seguidas da correta caracterização química do extrato e quantificação (KUNLE, 2012)

Atualmente, existe grande interesse para a descoberta e identificação de novos compostos de origem natural com atividade no organismo. Muitos desses compostos apresentam potentes efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e neuroprotetores (BAYAT et al., 2012).

Bayat (2012) em estudo para investigação neuroprotetora da planta *Melissa officinalis* em ratos e camundongos submetidos à isquemia cerebral, concluiu que o tratamento com este fitoterápico foi responsável por proteger o dano isquêmico mediado pela inibição do estresse oxidativo, bem como reduzir a morte de células por apoptose.

Outros trabalhos também demonstram sucesso no tratamento de isquemia cerebral a partir de medicamentos de origem vegetal. Isso ocorre, pois, os fitoterápicos podem apresentar característica antioxidante, anti-inflamatória, antiapoptótica, e até mesmo neuroprotetora. Outro fato importante é que os vegetais utilizados como medicamentos geralmente têm menos efeitos colaterais relatados do que os medicamentos alopáticos, e podem ser mais seguros de usar por um longo período de tempo (GAIRE, 2018).

De forma semelhante, nosso grupo de pesquisa vem se dedicando ao estudo de fitoterápicos e seus compostos isolados na prevenção e/ou tratamento de doenças do SNC.

Um estudo recente abordou o uso do extrato etanólico da planta medicinal CL em prevenir os sintomas motores e bioquímicos em modelo animal da doença de Parkinson. Evidências sugerem o envolvimento do estresse oxidativo, assim como a neuroinflamação como principais contribuintes para a degeneração neuronal observada na DP (GUPTA; DAWSON, 2010). De acordo com Moraes (2016) o tratamento com EECL preveniu alterações motoras e moleculares, amenizando os déficits dopaminérgicos desencadeados pela toxina parkinsoniana MPTP. Como uma possível justificativa, sugere-se que o tratamento com EECL foi responsável

pela diminuição da morte de neurônios dopaminérgicos e isso pode estar correlacionado com os principais fatores contribuintes.

Entre muitas substâncias originárias de plantas medicinais que apresentam potencial para o desenvolvimento de um fitomedicamento, o EECL é uma nova alternativa por apresentar compostos de ação anti-inflamatória e também antioxidante (LONGHI-BALBINOT et al., 2012; MORAES et al., 2016).

Membros da família Combretaceae compreendem aproximadamente 500 espécies e 14 gêneros distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo a África o principal centro de diversidade da família (NETO; CORDEIRO; LOIOLA, 2014). Utilizados para fins medicinais na África, Ásia, América do Sul e Índia, adicionalmente, *Combretum* espécies são amplamente utilizados como parte da medicina indígena para o tratamento de doenças que incluem dores abdominais, dores nas costas, bilharzia (esquistossomose), tosse, resfriados, conjuntivite, diarreia, febre, cefaléia, lepra, pneumonia, picada de escorpião e mordida de cobra e fraqueza geral. Especificamente, a espécie *Combretum Leprosum*, popularmente conhecida como mufumbo ou cipoaba, é preparada a partir de infusões com as partes aéreas (hastes, folhas e flores) e raízes e usadas como hemostáticos e sedativos para cicatrizar feridas durante o tratamento do sangramento uterino (LONGHI-BALBINOT., 2012; DUARTE et al., 2003; VIEIRA JÚNIOR et al., 2010). Pietrovski et al. (2006) investigou a ação antinociceptiva do EECL demonstrando um potente efeito analgésico sobre a nocicepção causada pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos. Animais que foram tratados por via oral com o EECL uma hora antes da injeção de glutamato apresentaram respostas nociceptivas menores do que os camundongos tratados com salina.

Outro estudo mostrou que o triterpeno pentacíclico TTHL (substância encontrada na CL) provocou efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios significativos num modelo murino de nocicepção visceral induzida por ácido acético e peritonite causada por carragenano. Demonstrou-se que o TTHL reduziu significativamente os níveis de citocinas pró-inflamatórias no fluido peritoneal de camundongos injetados com carragenano, inibindo também a ativação do sistema glutamatérgico (LONGHI-BALBINOT et al., 2012).

Della-Pace et al., (2013) demonstrou que CL proporcionou uma ação anticonvulsivante no trabalho em que utilizou-se um modelo de convulsão induzida pela droga antagonista GABAérgica PTZ (pentilenoterazol). Para o experimento foi utilizada em animais uma dose de 80 mg/kg de PTZ, após tratamento com uma dose de 30 mg/kg de TTHL. *Sabe-se que a* atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase contribui de maneira crucial para a manutenção do gradiente eletroquímico pelos potenciais de repouso de ação e captação e liberação de neurotransmissores no cérebro, sendo que qualquer alteração na atividade de Na^+/K^+ ATPase e com a estimulação do sistema glutamatérgico e a baixa estimulação do GABAérgico temos uma contribuição para a epilepsia (GRISAR; GUILLAUME; DELGADO-ESCUET, 1992). Foi observado neste estudo redução de crises convulsivas, sugerindo então que o TTHL pode estar ligado na manutenção da atividade da Na^+/K^+ ATPase, e além de produzir um efeito anticonvulsivante e ainda protegendo contra danos oxidativos.

Baseando nessas investigações, o EECL possui atividades biológicas já comprovadas em modelos animais, o que podemos sugerir uma nova aplicação terapêutica no tratamento do AVE.

2 JUSTIFICATIVA

O AVE está descrito entre as maiores causas de morte no mundo (MATSUMOTO et al., 2018) e a incidência de pacientes acometidos tende a aumentar ao longo do tempo devido ao aumento da expectativa de vida em alguns países (LACKLAND et al., 2012).

O aumento do número de pessoas afetadas por esta patologia levou a busca por estratégias de prevenção e reabilitação, entretanto, com foco principal na recuperação de funções motoras. De fato o tratamento com o alteplase auxilia na recuperação motora, porém pouco eficiente na prevenção e reabilitação dos danos cognitivos (JACKSON et al., 2012; BRUMMEL et al., 2012; NYS et al., 2006).

Embora estudos demonstrem que cerca de 30% dos indivíduos sobreviventes a um AVE apresentam algum tipo de comprometimento cognitivo, como déficit de atenção, memória, linguagem, orientação e lentidão acentuada no processamento da informação ou na execução de tarefas, até o momento, não há tratamentos efetivos para a redução desses danos (SUN et al., 2014), tornando relevante a identificação de novas estratégias.

O interesse em terapias alternativas, principalmente utilizando plantas medicinais e compostos extraídos de plantas vem crescendo, por apresentar vantagens, como uma alternativa facilmente acessível e muitas vezes mais barata quando comparada com medicamentos sintéticos (MORAES et al., 2016; LONGHI-BALBINOT et al., 2012). Além disso, os extratos possuem ação complexa, exercendo sua ação terapêutica frequentemente através de mais de uma via e com ação frequentemente evasiva (TSATSOS et al., 2017).

Contudo, com base nos resultados apresentados acima, pode-se sugerir que o EECL, com sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória, venha trazer benefícios para o tratamento de AVE. Dessa forma, este trabalho propôs investigar o potencial efeito neuroprotetor em AVE na prevenção de danos cognitivos, além dos possíveis mecanismos envolvidos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o potencial efeito neuroprotetor do extrato etanólico da planta medicinal *Combretum Leprosum* em prevenir e/ou minimizar os danos cognitivos apresentados por camundongos submetidos ao modelo de isquemia cerebral global (BCCAO).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Avaliar se o tratamento com o extrato etanólico de *Combretum leprosum* previne déficits cognitivos causado pelo AVE, na memória de curta duração no paradigma do reconhecimento de objeto;
- ii. Avaliar se o tratamento com o extrato etanólico de *Combretum leprosum* previne déficits cognitivos na memória espacial de referência;
- iii. Avaliar o possível efeito neuroprotetor do EE, através da quantificação da área de infarto e imunorreatividade ao marcador neuronal NeuN;
- iv. Avaliar o efeito do EECL na ativação de GFAP no hipocampo por imunoblot;
- v. Correlacionar estatisticamente a eventual melhora cognitiva com alterações avaliadas

O extrato etanólico da planta medicinal *Combretum Leprosum* previne déficits cognitivos em um modelo murino de isquemia cerebral global

Department of Physiological Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468 – Maruípe, Vitória-ES 29.043-910, Brazil

Laboratory of Neurochemistry and Behavior, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468 – Maruípe, VitóriaES 29.043-910, Brazil

Laboratory of Molecular and Behavioral Neurobiology, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468 – Maruípe, VitóriaES 29.043-910, Brazil

*Corresponding author at: Laboratory of Neurochemistry and Behavior, Department of Physiological Sciences, Health Sciences Centre, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES 29043910, Brazil.

E-mail address: cristina.silva@ufes.br (Cristina Martins-Silva).

Destaques

- EECL reduziu o volume de infarto
- EECL evitou déficit de memória de curto prazo.
- EECL evitou déficit de memória espacial
- EECL reduziu a morte celular neuronal
- A expressão de GFAP foi aumentada em animais isquêmicos

Abstract

Stroke is described as one of the main causes of death according to the World Health Organization (WHO). The AVE is subdivided into ischemic (AVEi) and hemorrhagic (AVEh), the first being more prevalent. The interruption of blood in a particular region of the brain in the AVEi creates two distinct regions in the tissue: the "ischemic nucleus" and the "ischemic penumbra". The cells of the ischemic nucleus are first affected from necrosis due to the direct lack of basic supplies for the cell survival, while cells in the penumbra region die from apoptosis, being this region feasible of intervention. Currently, the main pharmacological therapeutic approach involves the use of Alteplase, a thrombolytic drug that is extremely restricted. Thus, new approaches are needed to therapeutic spectrum, in addition to reducing the side effects. To this end, medicinal plants of the Brazilian flora are a powerful source for the development of medicines for the treatment of stroke. Given the above, our work evaluated the possible effect of the treatment with the ethanolic extract of the medicine plant *Combretum leprosum* (EECL) in preventing cellular and cognitive damage caused by AVEi in mice. Herein, in the present study, we used male mice of the *Mus species musculus* and Swiss lineage, 8-10 weeks (CEUA 53/2017 - UFES), which were submitted to a global ischemia / reperfusion (BCCAO) model and treated orally with EECL at the dose of 100mg / kg. The animals were randomly divided into four experimental groups: vehicle sham (saline + tween20) (SV), sham extract (saline + tween 20 + EECL) (SE), vehicle ischemia (IV) and ischemia extract (IE). After anesthesia recovery, the animals received two doses of EECL or vehicle at intervals of 3 hours between doses and this regimen was repeated 24 hours later. Subsequently, the dose became unique until the end of the experiments. The quantification of the infarct area showed a reduction of the ischemic area by 33%. Additionally, our data shows that the treatment decrease the cognitive deficits related to spatial memory and object recognition. The improvement found in the treatment of AVEi is possibly related to the increase of cells immunopositive for the neuronal marker NeuN in the Immunofluorescence assay in animals of the IE group, as well as the decrease of the expression of the marker of activated astrocytes GFAP in the same group. Overall, this report provides promising evidence of the potencial use of EECL in the treatment of stroke.

Key words: Ethanolic extract of *Cobretutum Leprosum*, cerebral ischemia, learning and memory, cognitive behavior

1. Introdução

O acidente vascular encefálico (AVE) é uma das principais doenças debilitantes e que levam a óbito no mundo, sendo o Brasil o líder em AVE na América Latina (PEDROSO et al., 2018).

Esta disfunção está envolvida a diversos fatores tais como doenças cerebrovasculares, hipertensão e aterosclerose (SHINODA, N. et al., 2017). Subdividido entre hemorrágico e isquêmico, o primeiro ocorre a partir da interrupção do fluxo sanguíneo por rompimento do vaso, enquanto o isquêmico (AVEi), com prevalência de 80% dos casos, tem sua ocorrência por obstrução de uma ou mais artérias cerebrais (JIANG, et al., 2018).

Durante o evento isquêmico, há redução ou comprometimento do fluxo sanguíneo cerebral em uma determinada área do cérebro (LI et al., 2017), o que leva ao surgimento súbito de déficits neurológicos característicos, tais como comprometimento motor, distúrbios de linguagem e déficits cognitivos (PEDROSO et al., 2018).

A depleção de sangue no SNC também é responsável por desencadear vários processos fisiopatológicos, como inflamação, estresse oxidativo, excitotoxicidade, apoptose e necrose de neurônios, que podem resultar em alterações motoras, sensoriais e cognitivas (DIRNAGL; IADECOLA; MOSKOWITZ, 1999).

O aumento do número de pessoas acometidas por AVEi trouxe a necessidade de novas estratégias de prevenção e reabilitação. Atualmente há um grande foco na recuperação das funções motoras, entretanto é crescente o número de pacientes com sequelas cognitivas após um evento isquêmico (JACKSON et al., 2012). O comprometimento cognitivo pós AVE é alto, e seus efeitos combinados aumentam significativamente o custo dos cuidados e a utilização dos recursos de saúde (CORRAO; LO COCO; LOPEZ, 2016). A atenção, memória, linguagem e orientação espacial são os principais danos encontrados em pacientes pós AVE, além disso a lentidão acentuada no processamento da informação ou para execução de tarefas se faz presente dificultando ainda mais a qualidade de vida do paciente (CUMMING et al., 2011). Ainda é possível dizer que além do comprometimento cognitivo, disfunções psiquiátricas como ansiedade, depressão são comuns (PEDROSO et al., 2018).

A terapia farmacológica convencional com o ativador do plasminogênio tecidual recombinante (rt-PA), possui uma limitação em seu uso devido à janela terapêutica estreita, além do grande número de efeitos colaterais. Outro fato é que ela tem se mostrado pouco eficaz na melhora dos déficits cognitivos, sendo na maioria dos casos eficaz na redução do dano motor após o AVE, (NYS et al., 2006; LEVINE; LANGA, 2011; LINDLEY et al., 2012). Considerando essas limitações da terapia atualmente disponível, novas estratégias são necessárias para melhorar a qualidade de vida do paciente e o prognóstico da doença (KURODA et al., 2011).

O uso de terapias alternativas vem sendo estudada na reabilitação pós-isquemia (LI et al., 2017). A terapia com plantas medicinais e compostos extraídos de plantas tem mostrado resultados promissores, além de serem alternativas que apresentam vantagens como fácil acesso e baixo custo se comparada aos medicamentos sintéticos (MORAES et al., 2016; SOLEY et al., 2012).

Nos últimos anos, os estudos realizados a fim de identificar os mecanismos responsáveis pela ação terapêutica da planta *Combretum leprosum* (CL), cada vez mais demonstram avanços e resultados satisfatórios. Sua ação antinociceptiva foi investigada por Pietrovski et al., 2006, em que foi observado o potente efeito analgésico da planta sobre a nocicepção causada pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.

DELLA PACE et al., 2013, demonstrou a ação anticonvulsivante de um composto isolado da CL, o triterpeno TTHL, utilizando como modelo de convulsão, a droga pentilenotetrazol (PTZ), um antagonista GABAérgico, na dose de 80 mg/kg, i.p em camundongos. Os animais receberam o composto (30 mg/kg, p.o.) 60 minutos antes da injeção com PTZ e como resposta a tratamento, o TTHL foi capaz de reduzir as crises convulsivas induzidas por PTZ.

O triterpeno TTHL (0.01–10 mg/kg) também demonstrou efeito anti-inflamatório em estudo utilizando modelos de inflamação induzidos por ácido acético (i.p.) (LONGHI-BALBINOT et al., 2012)

Em trabalho relacionando CL e a Doença de Parkinson (DP), o tratamento com EECL, impediu alterações motoras e moleculares, revertendo as alterações bioquímicas desencadeadas pelo MPTP, droga utilizada para desenvolver o modelo de DP (MORAES et al., 2016). Diante de todo exposto acima, verifica-se que a CL está dentre as substâncias que apresentam potencial para o desenvolvimento de um

fitoterápico, já que apresenta compostos que se destacam e são responsáveis por desencadear ação antiinflamatória e antioxidante em modelos in vivo (LONGHI-BALBINOT et al., 2012; MORAES et al., 2016).

Portanto, neste presente projeto, buscamos verificar o potencial efeito neuroprotetor do extrato etanólico de *Cobretum Leprosum* em um modelo animal experimental de isquemia cerebral global (BCCAO), sobretudo se o tratamento com EECL previne déficits cognitivos causados pelo AVEi,

2. Materiais e Metodos

2.1 Animais

Um total de 105 camundongos machos suíços (8-12 semanas de idade), pesando 35-45g, foram utilizados para conduzir os experimentos. Foram respeitados os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, www.cobea.org.br), que estão de acordo com as normas internacionais de pesquisa envolvendo animais. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) (protocolo número 53/2017).

2.2 Design Experimental

Os animais foram divididos em quatro grupos independentes, de acordo com as condições e a cirurgia, denominados veículo sham (SV), extrato sham (SE), veículo de isquemia (IV) e extrato de isquemia (IE).

Os animais foram alojados em viveiro próprio no Laboratório de Neuroquímica e Comportamento da UFES e foram mantidos em caixas de polipropileno (38 cm x 20 cm x 13 cm) sob um ciclo escuro e claro de 12 / 12h, em temperatura ambiente (22 ± 2 ° C) com água e alimento *Ad Libitum*.

2.3 Indução de isquemia cerebral global

Os animais foram anestesiados por xilazina (20 mg / kg, i.p.; Sedomin, Argentina) e 2,2,2-tribromoetanol (200 mg / kg, i.p.; Sigma-Aldrich). O protocolo de isquemia cerebral global utilizado foi adaptado de Tsuchiya et al. (2002). A isquemia global foi induzida pela oclusão da artéria carótida comum bilateral (BCCAO). Os animais foram colocados na posição dorsal, a região da traqueia foi exposta e, ambas as carótidas comuns (cca) foram cuidadosamente separadas por dissecação do nervo vago para oclusão temporária com fio de algodão (cca direito) e oclusão permanente (cca esquerda) com fio de náilon (5-0 1,5 cm, Shalon). A reperfusão do direito c.c.a. foi realizada após 60 minutos e foi confirmada visualmente. Em seguida a pele foi suturada com fio de nylon. Em animais operados por simulação, ambos os c.c.a. foram expostos, mas não ocluídos. Os camundongos foram autorizados a se recuperarem em gaiolas.

2.4 Quantificação da Área de Infarto

Um grupo de animais isquemia extrato (IE) e isquemia veículo (IV) foram decapitados 48 horas após a indução da isquemia e os cérebros foram removidos e secções coronais de 2 mm foram feitas. As fatias foram imersas em solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio a 2% (Sigma-Aldrich) a 37 ° por 20 minutos. As áreas infartadas não coradas foram medidas usando o software ImageJ (1,49g / Java 1.6.0, 32 bits) e calculadas como uma porcentagem de todas as seções coronais.

2.5 Teste de reconhecimento de Objetos

O protocolo NOR utilizado foi adaptado de (BARBIERI et al., 2016). Os animais foram habituados na caixa experimental 30 minutos por três dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a habituação, na sessão treinamento, os animais puderam explorar livremente dois objetos idênticos por 15 minutos, distantes entre si por 10 cm. A memória de curta duração (STM) foi avaliada em grupos distintos de animais, 1,5 horas após a sessão de treinamento. Durante este tempo de teste, os

camundongos foram devolvidos à arena que continha um dos objetos originais ("familiares") e um novo objeto diferente em forma e cor ("romance"). Durante a troca dos animais, a limpeza das caixas e objetos foi feita com álcool 70%. O tempo de exploração foi definido como cheirar ou tocar o objeto com o nariz e o mesmo foi quantificado pelo software AnyMaze®. Por fim o índice de reconhecimento foi definido como a proporção do tempo gasto explorando o objeto romance menos o tempo da exploração familiar sobre o tempo total gasto explorando ambos os objetos de reconhecimento.

2.6 Teste de Memória Espacial de Referência

O labirinto aquático de Morris (MWM) consiste em uma piscina circular escura (136 cm de diâmetro e 60 cm de altura) com água (20 ± 1 ° C). A piscina foi dividida geograficamente em quatro quadrantes pelas direções cardeais (N, E, S e W). Uma plataforma redonda preta foi colocada a 1,0 cm abaixo da superfície da água, no centro de um dos quadrantes. Pistas espaciais foram colocadas ao redor da sala para ajudar na orientação espacial do animal. A fase de aprendizagem consistiu em 8 dias consecutivos (4 tentativas por dia saindo dos quatro pontos cardeais). Em cada sessão os camundongos foram autorizados a nadar 60 segundos para encontrar a plataforma escondida, e em cada tentativa, os roedores foram liberados em um dos quadrantes. Depois que a plataforma foi encontrada, o mouse permaneceu na plataforma por 15 segundos. Os animais que não encontraram a plataforma no tempo de até 60 segundos, gentilmente estes foram guiados para a plataforma pelo experimentador. Toda a análise de vídeo foi realizada a partir do software Anymaze®.

2.7 Imunofluorescência

O protocolo de imunofluorescência utilizado foi adaptado de Martins-Silva et al., 2011. Os camundongos foram anestesiados com xilazina / cetamina (via I.P. 90 mg / kg e 20 mg / kg, respectivamente) e perfundidos com solução tampão PBS e solução de formaldeído (4%). Após a perfusão, os cérebros dos animais foram removidos e imersos em soluções de preservação crioprotetora para seccionamento do criostato

na espessura de 20 micrômetros. Após as seções, as fatias foram colocadas em lâminas previamente gelatinizadas.

Para imunofluorescência, as lâminas com tecido foram incubadas durante 48 horas a 4° C com anticorpo de núcleos neuronais anti-coelho (NeuN) (1: 100, Millipore, MAB 377), com tampão de incubação (soro de cabra normal a 5%; Triton a 0,3% em PBS). Após o tratamento adequado das lâminas e lavagens com PBS, para a segunda parte do procedimento, a incubação do anticorpo secundário foi realizada por 2 h com imunoglobulina Alexa Fluor 488 (IgG, NeuN) (Invitrogen) e a marcação nuclear foi realizada com (DAPI) (Sigma) à temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram seladas e analisadas em microscópio (Leica-Microsystems) e a morte neuronal foi quantificada usando o programa ImageJ.

2.8 Análise da expressão de proteína

O hipocampo foi homogeneizado em tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 e inibidor de protease) e mantidos em gelo durante 30 minutos. A centrifugação foi seguida, com subsequente coleta do sobrenadante (Areal, et al., 2015). Os 60 microgramas de proteína foram então separados por SDS-PAGE e depois transferidos para a membrana de PVDF. A expressão da proteína Actina foi usada como controle interno. O anticorpo utilizado foi anti-GFAP (1: 1000 Millipore) mouse IgG e anti-mouse. As imagens foram adquiridas usando o ChemiDoc (Bio-rad) e analisadas pelo software Image Lab (Bio-rad).

2.9 Análises Estatísticas

Os dados comportamentais foram analisados através de ANOVA, com medidas repetidas seguidas por post hoc de Bonferroni. Para análise da expressão de proteínas foi utilizado a anova de uma via com post hoc de Bonferroni. A análise da área do infarto foi realizada através dos testes t de Student. Todos os dados estão representados como a média \pm EPM com $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

3. Resultados

3.1 Análise da área de infarto

A fim de examinar se o EECL poderia produzir diminuição da área de infarto provocado pela isquemia em nível morfológico, foi realizada coloração por TTC.

Camundongos dos grupos isquemia tratado e não tratado exibiram área de infarto com morte neuronal (Fig. 2A), entretanto no grupo tratado, a área foi menor.

A quantificação da área do infarto foi mostrada na figura 2B, na qual o grupo IV apresentou uma área de infarto de $51,61\% \pm 3,36$ ($n= 6$), enquanto o grupo IE, que recebeu EECL, apresentou uma diminuição da área de infarto em 33%, chegando a $18\% \pm 3,285$ ($n= 4$). Assim, verificamos que o extrato foi capaz de reduzir significativamente a área de infarto [$p = 0,0002$].

3.2 Reconhecimento de Objeto

A memória de curta duração (MCD) foi examinada através do teste de reconhecimento de objeto (RO). Durante o treino (Figura 3A) não foi observado nenhum déficit motor conforme a distância percorrida [$F (3, 38) = 1.311$; $p= 0.2849$] e os animais exploraram de maneira semelhante ambos objetos, mostrando não apresentar preferência, como apontado na Anova de duas vias [$F (1, 38) = 0.6835$; $p=0.4135$] (Figura 3B). Ao realizar o teste de memória, através da exploração do objeto familiar e novo, constatamos que os animais IV apresentaram prejuízo em sua memória de reconhecimento de objetos quando comparados aos demais grupos ($p>0.9999$). Entretanto, os animais IE apresentaram uma diminuição desse prejuízo apresentando um comportamento semelhante aos animais do grupo SV ($p=0.0275$) (Figura 3C). Este prejuízo foi observado igualmente através do índice de discriminação (Figura 3D), em que os animais do grupo IV tiveram um menor índice em comparação aos demais grupos [$F (3, 38) = 11.9$, $p<0.0001$]. O índice de discriminação do grupo não tratado (IV) foi de 10%, enquanto do grupo tratado IE foi de 40% aproximadamente.

3.3 Memória Espacial de Referência

A aprendizagem e a memória espacial foram avaliadas usando o teste do labirinto aquático de Morris (MWM). A latência para encontrar a plataforma oculta durante os oito dias de treino no MWM foi diminuindo ao longo das sessões, sugerindo que todos aprenderam a tarefa [$F(7, 308) = 57.18$; $p < 0.0001$] (Figura 4B). No entanto, a ANOVA two-way com medidas repetidas mostrou que os animais do grupo IV apresentaram maior latência em relação com os demais grupos, indicando um comprometimento cognitivo [$F(3, 44) = 7.044$; $p = 0.0006$]. Com a finalidade de avaliar a memória, após vinte e quatro horas da última sessão de treino, os animais foram submetidos ao teste comprobatório (PROBE), onde nadaram livremente por 120s sem a plataforma de escape. A ANOVA de duas vias com Post hoc de Bonferroni [$F(1, 43) = 40.79$; $p < 0.0001$], mostrou que com exceção dos animais IV ($p > 0.9999$), os animais SV, SE e IE ($p = 0.0162$; $p = 0.0457$; $p = 0.0356$ respectivamente) gastaram mais tempo explorando o quadrante alvo em relação ao quadrante oposto, reconhecendo a localização da plataforma de escape (Figura 4C). Os animais IV não foram capazes de distinguir a localização da plataforma de escape ($p > 0.9999$). O prejuízo observado nos animais do grupo IV, não está relacionado com alterações motoras, visto que não houve diferença estatística na velocidade de nado (Figura 4A) [$F(3, 43) = 0.7234$; $p = 0.5436$].

3.3 Imunofluorescência

Com finalidade de avaliar a morte neural analisamos a imunorreatividade ao marcador NeuN e observamos diferenças na região do hipocampo e nas regiões proximais como o córtex ipsilateral da lesão entre os grupos IV e IE (Figura 5). O lado do encefalo ipsilateral à oclusão permanente das carótidas comuns dos camundongos foi o mais afetado, quando comparado ao lado contralateral com reperusão. Desta forma, as células reativas a NeuN na regiões ipsilateral foram menos evidentes no grupo IV, se comparado ao grupo IE que recebeu o tratamento de EECL.

3.5 Análise da Expressão de Proteína por imunoblot

As mudanças relativas na expressão de proteínas para o marcador inflamatório de Proteína ácida fibrilar glial (GFAP) foram avaliadas por imunoblot e os resultados obtidos estão apresentados na figura 6. A partir da análise de variancia Anova de uma via, o resultado foi estatisticamente significativo [$F(3, 12) = 3.608$; $p=0.0458$], entretanto nas comparações múltiplas com Post hoc de Bonferroni, a diferença foi acentuada entre o grupo IV e IE ($p=0.0920$).

4. Discussão

O interesse no uso de compostos e substâncias de origem vegetal na medicina vem ganhando destaque devido aos avanços da área científica, permitindo o desenvolvimento de drogas testadas e aprovadas para uso seguro em humanos. O uso de CL não é recente sendo comum até hoje. A preparação de infusões, a partir de caules, folhas, flores e raízes, sempre foi utilizada na medicina popular como sedativo, cicatrizante, etc. (LIRA, 2002).

De acordo com análises fitoquímicas, a CL possui várias classes de compostos que podem contribuir para o seu efeito biológico, entre estes, ácidos arjunolico, mélicos, ácidos graxos, triterpeno 3β , 6β , 16β -tri-hidroxilup-20 (29) -en (TTHL), flavonóides, 3-O-metilquercetina e quercetina (FACUNDO et al., 1993).

Devido a sua eficácia anti-inflamatória e antioxidante (HORINOCHI et al., 2013; (DELLA PACE, 2013; MORAES et al., 2016), verificada na forma de administração com EECL ou na forma isolada com o TTHL, tendo em vista a sua eficácia no uso em modelos animais de inflamação e recentemente de neurodegeneração (MORAES, 2016), podemos inferir que esta planta possui potencial promissor no tratamento da lesão isquêmica cerebral.

Assim como o EECL, outras drogas de origem vegetal tem sido alvo de interesse no tratamento do acidente vascular encefálico, posto que as estratégias terapêuticas convencionais para estes pacientes são limitadas, embora apresente resultados pré-clínicos promissores (WIDMANN et al., 2018). Com este objetivo, vários modelos animais foram desenvolvidos para estudar a neurobiologia do AVE (SINGH et al., 2017), sobretudo em modelo de isquemia cerebral e reperfusão (I/R) realizado neste estudo.

Os mecanismos fisiopatológicos encontrados na enfermidade do AVE causam extremo prejuízo neuronal. Atualmente, sabe-se que o papel do estresse oxidativo no desenvolvimento de lesão cerebral mediada por I/R está bem esclarecido (Reynolds, 2007; NOUR; SCALZO; LIEBESKIND, 2013). O hipocampo é uma das regiões que apresenta grande comprometimento no AVE devido a elevada necessidade de aporte energético e, dessa forma, possui maior sensibilidade aos efeitos deletérios das EROs, que por sua vez são responsáveis por prejudicar biomoléculas como DNA, lipídios, proteínas (GOEDERS et al., 2010).

No presente estudo, avaliamos animais submetidos à tarefa de Memória de Curta Duração (STM) no paradigma de Reconhecimento de Objeto (NOR). Esse teste tem sido utilizado para investigar a memória de reconhecimento de objetos e sua alteração durante desordens neuronais (ENNACEUR, A., DELACOUR J., 1988).

Evidências científicas apontam que o AVE isquêmico causa déficits na memória de reconhecimento de objetos de curto prazo (ALTERMANN et al., 2017) o que é consistente com os nossos dados em que foi observado prejuízo na memória de curta duração. Izquierdo et al., (1998) mostrou que a STM depende da integridade do hipocampo, e de fato trabalhos mostraram que os déficits cognitivos causados pela isquemia estão fortemente correlacionados com a plasticidade neuronal na região CA1 do hipocampo (WANG et al., 2019).

Assim como o STM a memória espacial acessada no Labirinto Aquático de Morris (MWM), também depende da integridade do hipocampo (NELL et al., 2016). De forma semelhante verificamos um comprometimento cognitivo em animais isquemia veículo no aprendizado da tarefa, corroborando com vários relatos que mostraram que a hipoperfusão cerebral leva a prejuízos na aprendizagem e na memória, devido à injúria na região hipocampal (WEI, ZHANG, 2018; LIU et al., 2017; KHOSHNAMEH et al., 2018).

O prejuízo encontrado nos diferentes tipos de memória foi atenuado quando os animais que obtiveram o tratamento proposto neste trabalho com EECL apresentaram redução na latência ao longo das sessões de aprendizagem e no reconhecimento de novos objetos.

Relatos indicam que os flavonoides, fitoquímico encontrado na EECL, podem ser responsáveis por exercerem ação neuroprotetora, sobretudo em animais após

isquemia no modelo BCAAo (SINGH et al., 2017), com ação preventiva a excitotoxicidade mediada pelo glutamato na região do hipocampo (DA SILVA et al., 2018). O mecanismo referente a esses efeitos pode estar relacionado pela capacidade em modular o sistema imunológico no cérebro, atenuando a neuroinflamação pela inibição da produção de óxido nítrico (NO) e citocinas induzidas pela micróglia ativada (HUSSAIN et al., 2018).

Tsatsos et al., 2017, afirma que extratos de plantas possuem ação mais complexa que compostos sintéticos e exercem sua ação terapêutica frequentemente através de mais de uma via e que além da via de modulação do sistema imunológico, possa existir outras vias ainda não bem elucidadas. A partir dessas observações, podemos inferir que também existe uma correlação com o resultado encontrado na avaliação da morte celular na região do hipocampo pelo método de imunofluorescência com o marcador NeuN.

Complementarmente, um fato importante a citar, são os antioxidantes endógenos tais como: a glutathione e a superóxido dismutase (SOD) que são consideradas importantes antioxidantes envolvidos na manutenção do balanço oxidativo (HE et al., 2012). Durante a I/R, estes são insuficientes para neutralizar a geração maciça de ROS, o que é importante para aumentar a lesão no tecido cerebral (HE et al., 2012). Muitos trabalhos demonstraram que camundongos que superexpressam a SOD exibiram redução do estresse oxidativo, bem como da lesão cerebral mediada por IR, indicando que intervenções que elevam os níveis de antioxidantes endógenos podem ser benéficas na melhora do resultado funcional após lesão cerebral mediada por IR (SINGH ET AL., 2017). Como um possível mecanismo, o extrato de CL pode ter sido importante, contribuindo para a diminuição da lesão, favorecendo o aumento de antioxidantes endógenos.

Dando continuidade aos nossos achados, em nível macroscópico, O EECL reduziu significativamente a área do infarto o que ficou evidente com a análise microscópica pela imunofluorescência, que o EECL possui mecanismos de ação que podem agir diretamente, reduzindo a inflamação, excitotoxicidade e/ou dano oxidativo o que consequentemente inferem para a redução da morte neuronal (HE et al., 2012). O desequilíbrio entre os marcadores oxidantes e antioxidantes na lesão de I / R é um precursor de aumento na inflamação visto também por um aumento de TNF- α , iNOS e IL-1 β em outros trabalhos (MOHAMED et al., 2019). Além dos flavonoides, outro

fitoquímico encontrado na CL, o triterpeno TTHL, já possui descrição na literatura por apresentar potencial efeito anti-inflamatório (LONGHI-BALBINOT et al., 2012). Longhi-Balbinot et al. (2012) apontou que esse composto em modelo animal de inflamação, levou redução nos níveis de TNF- α e IL-1 β .

Essas observações são consistentes com as medidas de volume do infarto observado e com trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, em que propõe que a CL apresenta efeito antioxidante e anti-inflamatório para doenças neurológicas como a DP (MORAES et al., 2016).

Por outro lado, as respostas neuroinflamatórias após o evento isquêmico desempenham um papel crítico nos desfechos do AVE. Após o trauma, a cascata inflamatória aparece como uma tentativa de restaurar o sistema nervoso central para recuperação ou como parte do dano cerebral, sendo a inflamação um dos contribuintes para a lesão cerebral após a isquemia (HE et al., 2012). Desde as primeiras horas após o início da isquemia, a mobilização de células microgliais, astrócitos e macrófagos contribui para a patogênese da doença através da liberação de mediadores inflamatórios (FU et al., 2015), que contribui para um processo de morte neuronal (OHAB et al., 2006). A resposta astrocítica também é considerada um componente chave da resposta celular ao dano do SNC, que pode exercer efeitos prejudiciais e benéficos durante o processo de reparo. Nos primeiros dias após o início da isquemia, o acúmulo de astrócitos na região da penumbra contribui para a redução dos danos celulares, liberando fatores de crescimento e controlando os níveis de radicais livres e glutamato, evitando a excitotoxicidade (CHISHOLM; SOHRABJI, 2016).

Os astrócitos podem se tornar reativos após vários insultos cerebrais; no entanto, as funções dos astrócitos reativos são pouco compreendidas (MORIZAWA et al., 2017). Diversos trabalhos revelam que após lesão os astrócitos promovem a formação de cicatriz glial e produção de grandes quantidades de componentes da matriz extracelular, como proteoglicano de sulfato de condroitina, alterando o ambiente de crescimento axonal e inibindo severamente a regeneração nervosa (YUAN et al., 2017). Entretanto, a curcumina, um composto natural com propriedades antiinflamatória e antioxidante, se mostrou eficaz na diminuição da expressão de GFAP, bem como redução na deposição de proteoglicano de condroitina-sulfato de

matriz extracelular, contribuindo para a recuperação da função neurológica (YUAN et al., 2017).

Nesse contexto, nosso estudo confirma esses achados, uma vez que, verificamos que os animais IV tiveram ativação de astrócitos, enquanto os animais IE tiveram uma atenuação da expressão dessas células. Outro fato importante é que o EECL foi capaz de reduzir drasticamente os níveis de GFAP em animais do grupo IE, tornando estes semelhante aos controles.

Em resumo, nós fornecemos uma descrição dos efeitos do EECL in vivo no modelo, focando em mudanças bioquímicas e comportamentais em resposta ao Acidente Vascular Encefálico, trazendo novas evidências do potencial terapêutico do EECL em camundongos. Diante de nossos achados, o EECL apresenta potencial para reduzir os danos causados pela lesão da isquemia.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao laboratório do Centro de Ciências da Saúde Laboratório de Histologia e Imunoistoquímica (LHMI). Este trabalho contou com o apoio do Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Legendas

Fig. 1. Delineamento experimental: Os animais foram submetidos a cirurgia de isquemia/reperfusão ou simulação no dia 1 com 60 dias de idade. No mesmo dia após três horas a cirurgia iniciou a gavagem respeitando duas doses com intervalo de três horas para cada uma. No dia três, um grupo de animais (1) foi designado para o teste comportamental NOR, enquanto outro grupo para o MWM (2). No dia 7, os animais do grupo 1 foram eutanasiados e o hipocampo foi dissecado para análise de Western blotting e imunofluorescência. Os animais do grupo 2 foram eutanasiados no dia 11. Ao final, foi realizada a análise estatística dos dados.

Fig. 2. O EECL reduziu a área do infarto. Fig. 2A. Imagens representativas. Fig. 2.B. Análise quantitativa da área do infarto. Os dados são expressos como média \pm SEM. Teste t de Student não pareado. *** [$p \leq 0.001$].

Fig. 3. NOR. Fig. 3A. A habituação foi realizada 48 horas após o AVE Isquêmico em animais tratados com veículo (Tween 20 + Saline 0,9%) a 3% e animais tratados com EECL 100 mg/kg. A fase de habituação foi realizada antes da fase de Treinamento e Teste. Os animais não apresentaram comprometimento motor. A estatística empregada foi Anova de uma via com Post hoc Bonferroni. [$P = 0,1300$]. Fig. 3B. Sessão Treinamento. O experimento foi realizado antes da Fase de Teste (Exploração de Objetos) 72h após a primeira habituação, em animais tratados com veículo (Tween 20 + Saline 0,9%) a 3% e animais tratados com EECL 100 mg / Kg. A estatística empregada foi ANOVA de duas vias com Post hoc de Bonferroni ($p = 0,4396$). Fig. 3C. Exploração do objeto. O experimento foi realizado após a fase de treinamento em animais isquêmicos tratados com veículo (Tween 20 + Saline 0,9%) a 3% e animais tratados com EECL 100 mg / kg. A estatística utilizada foi ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. [$P < 0,0001$]. Os animais IV tiveram um déficit no STM ($p > 0,9999$). Fig. 3D. Índice de discriminação. O gráfico foi feito a partir da diferença no tempo de exploração do novo objeto e familiar dividido pela soma do tempo total de exploração de ambos os objetos. A estatística empregada foi ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. [$P = 0,0143$]. O grupo IV apresentou menor taxa de discriminação para o novo objeto em relação ao grupo SE [$P = 0,0100$].

Fig. 4. MWM. Fig. 4A Velocidade média. Os animais foram tratados com veículo (Tween 20 + Saline 0,9%) a 3% ou tratados com EECL100 mg / kg. Os animais não apresentaram comprometimento motor de acordo com a ANOVA one-way [$p = 0,5436$]. Fig. 3B. Fase de treinamento. O tempo de latência para encontrar a plataforma oculta durante os oito dias de testes de treinamento de MWM foi reduzido nos grupos experimentais SV, SE, IE, [$P < 0,0001$], entretanto os animais Isquemia veículo tiveram maior latência. Fig. 3C. Probe. A ANOVA de duas vias com post hoc de Bonferroni mostrou que os animais isquemia veículo passaram menor tempo no quadrante alvo indicando um prejuízo na memória espacial.

Fig. 5. O EECL reduziu a expressão da proteína GFAP por análise quantitativa da expressão de GFAP. O resultado foi significativo [$P = 0,0458$], embora nas comparações múltiplas com Bonferroni post hoc, não tenha havido uma comparação significativa entre os grupos isquemia [$P = 0,0921$].

Fig. 6. A EECL reduziu a morte neuronal. Representação dos grupos isquemia veículo e extrato através da técnica de imunofluorescência com marcação com o anticorpo NeuN no hipocampo esquerdo (HE) de animais submetidos à isquemia cerebral.

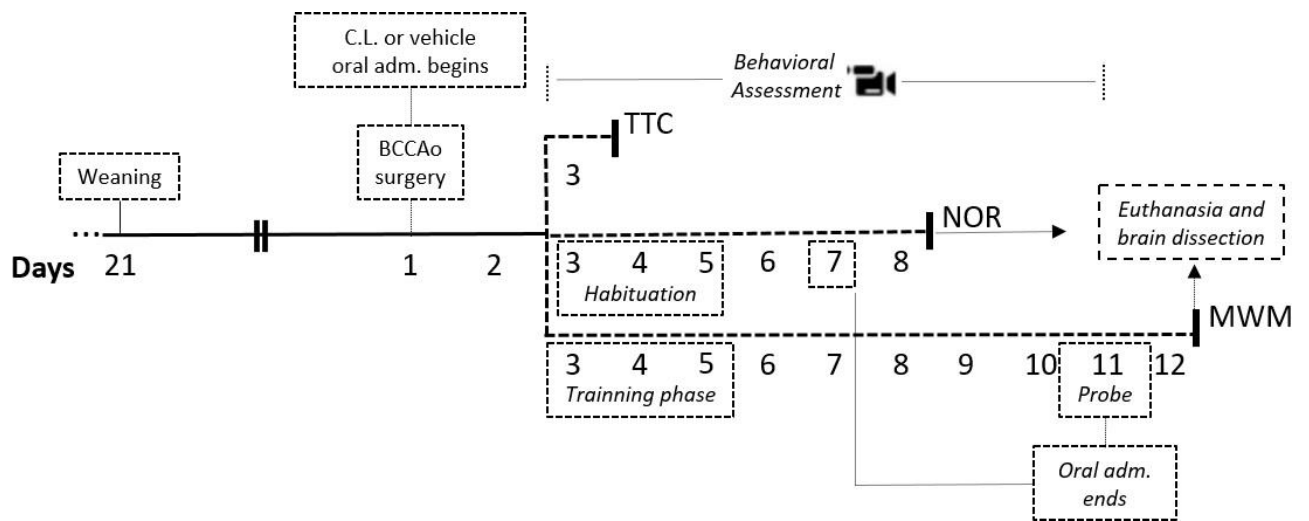


Figure 1

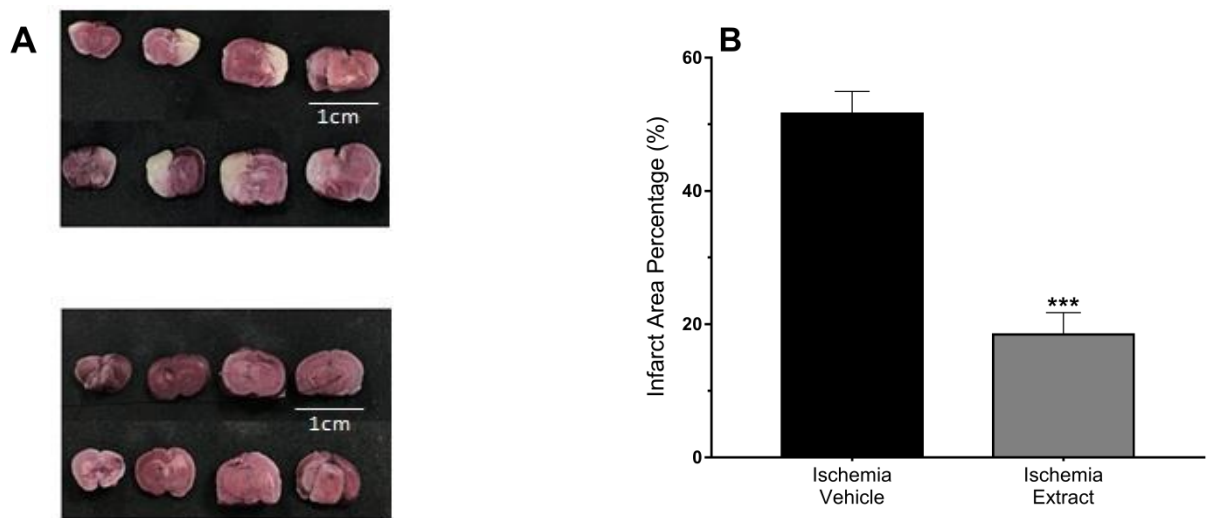


Figure 2

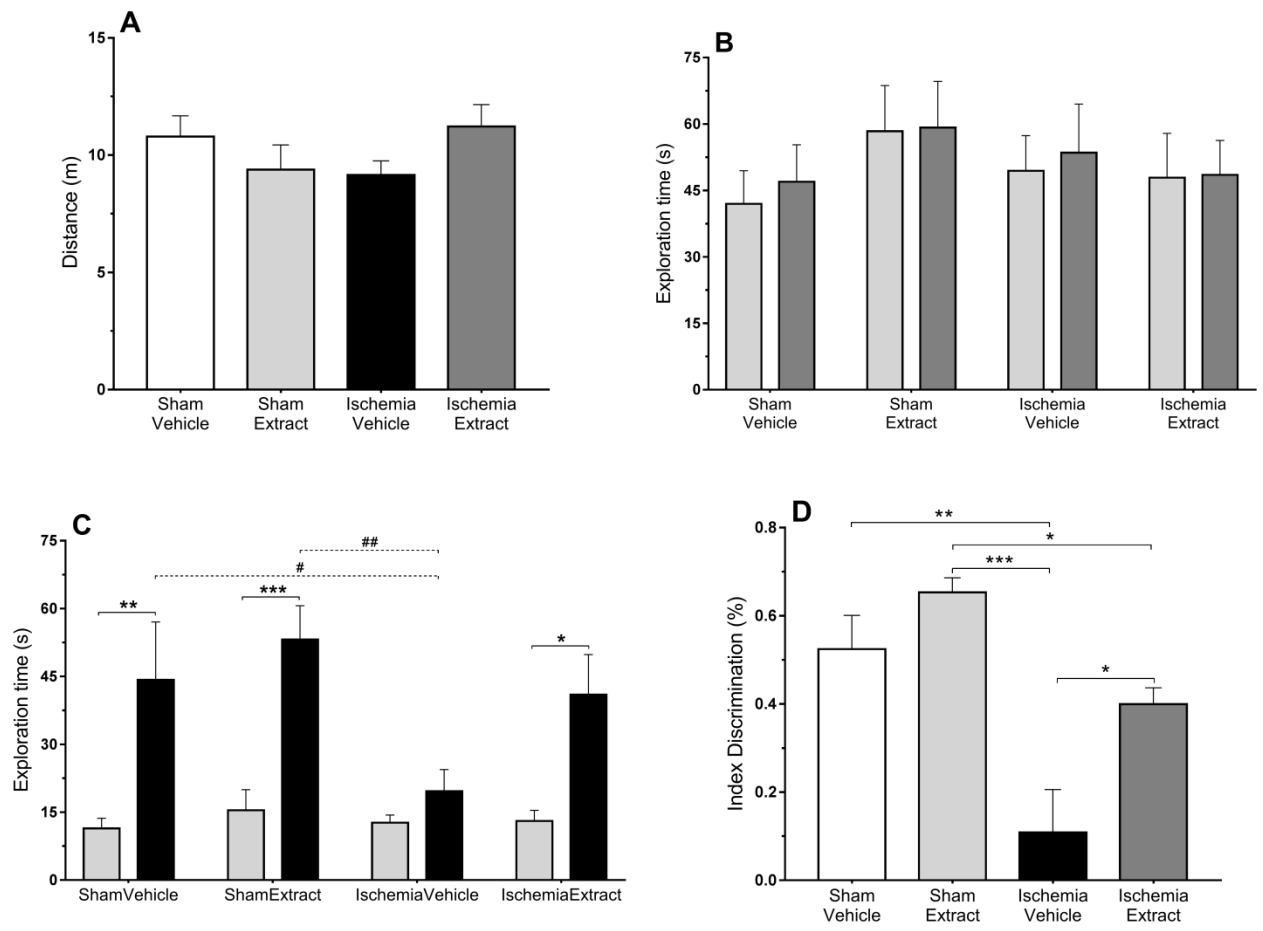


Figure 3

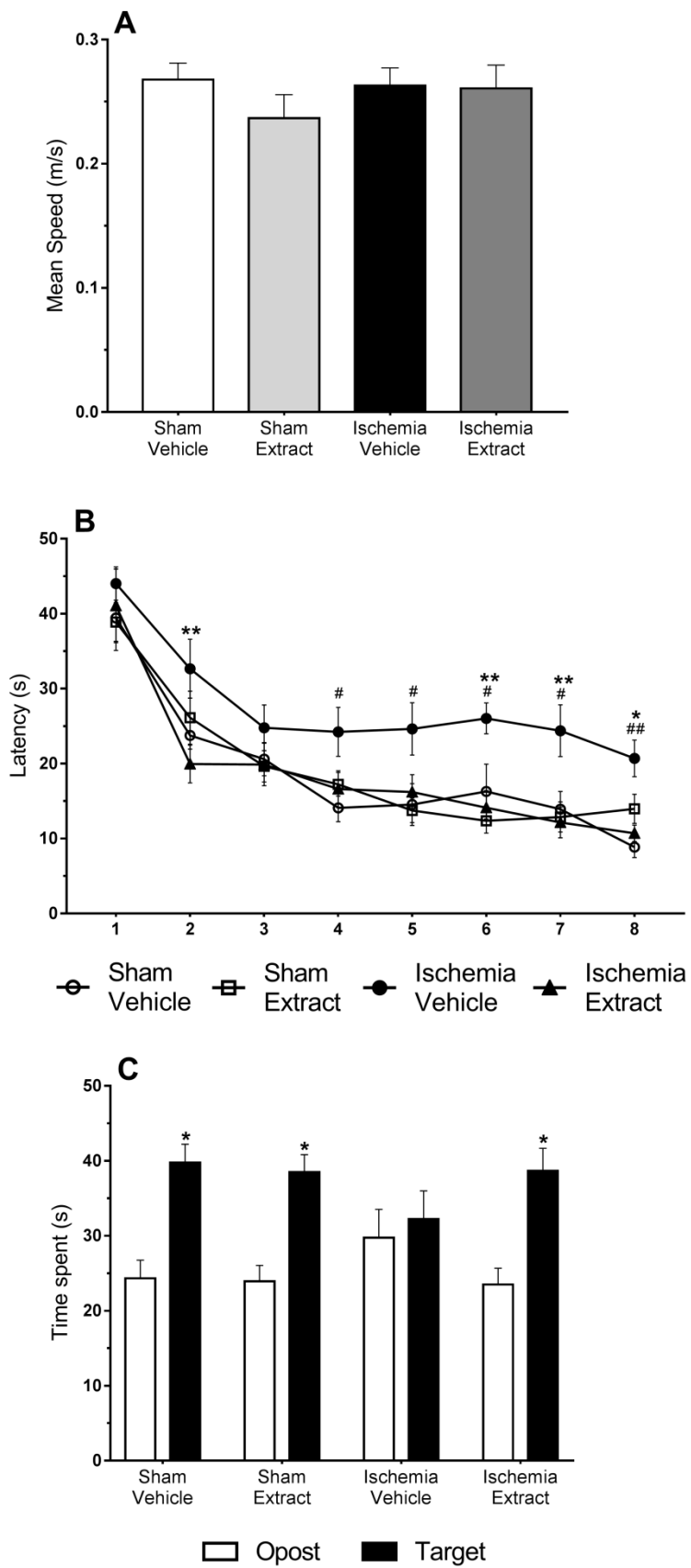
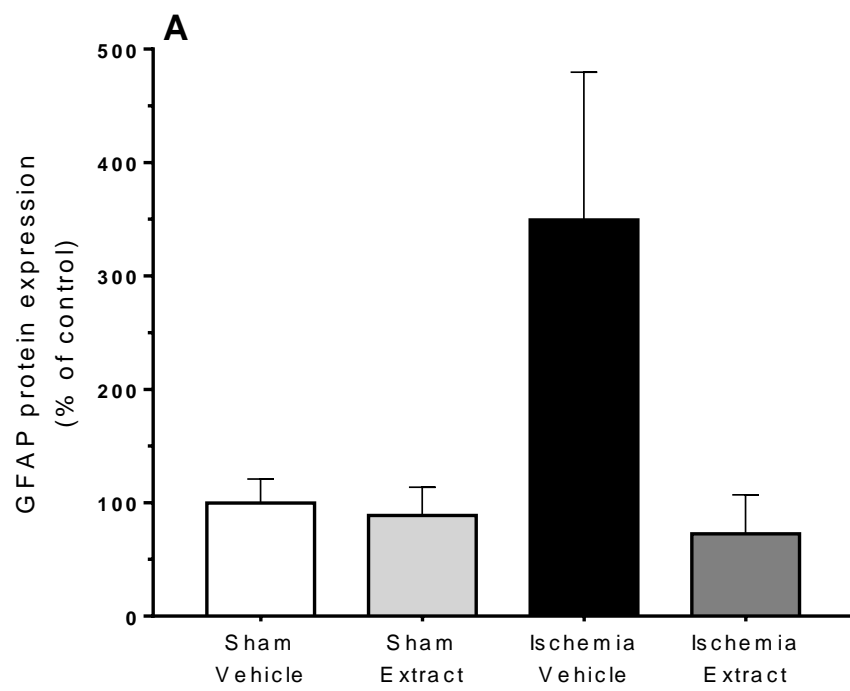


Figure 4



GFAP



β-actin

Figure 5

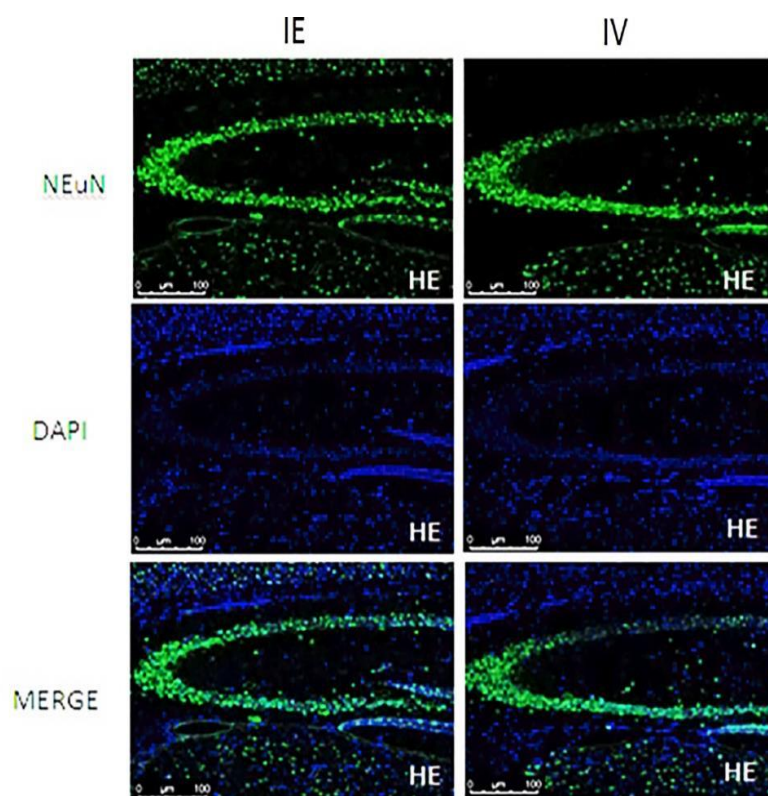


Figure 6
50

REFERENCIAS

- ALTERMANN, C. D. C. et al. Short-term green tea supplementation prevents recognition memory deficits and ameliorates hippocampal oxidative stress induced by different stroke models in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 131, n. June 2016, p. 78–84, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.03.007>>.
- APPIREDDY, R. M. R. et al. Endovascular therapy for ischemic stroke. **Journal of Clinical Neurology (Korea)**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2015.
- BAGGIO, C. H. et al. Anti-inflammatory effect of triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20(29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 59–64, 2012.
- BARBIERI, M. et al. Synthetic cannabinoid JWH-018 and its halogenated derivatives JWH-018-Cl and JWH-018-Br impair Novel Object Recognition in mice: Behavioral, electrophysiological and neurochemical evidence. **Neuropharmacology**, v. 109, p. 254–269, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.06.027>>.
- BARONE, F. C.; FEUERSTEIN, G. Z. Inflammatory mediators and stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 19, p. 819–834, 1999.
- BAYAT, M. et al. Neuroprotective properties of *Melissa officinalis* after hypoxic-ischemic injury both in vitro and in vivo. **DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2012.
- BERNHARDT, J. et al. The effect of physical activity on cognitive function after stroke: a systematic review. **International Psychogeriatrics**, v. 24, n. 04, p. 557–567, 2011.
- BONOVA, P. et al. Development of a pattern in biochemical parameters in the core and penumbra during infarct evolution after transient MCAO in rats. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 1, p. 8–14, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2012.10.015>>.
- BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. de M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2675–2685, 2012.
- CEKANAVICIUTE, E.; BUCKWALTER, M. S. Astrocytes: Integrative Regulators of

Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases. **Neurotherapeutics**, v. 13, n. 4, p. 685–701, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s13311-016-0477-8>>.

CHEN, Y. et al. Morin Mitigates Oxidative Stress, Apoptosis and Inflammation in Cerebral Ischemic Rats. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines**, v. 14, n. 2, p. 348–355, 2017. Disponível em: <<http://journals.sfu.ca/africanem/index.php/ajtcam/article/view/4604/pdf>>.

CHISHOLM, N. C.; SOHRABJI, F. Astrocytic response to cerebral ischemia is influenced by sex differences and impaired by aging. **Neurobiology of Disease**, v. 85, p. 245–253, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2015.03.028>>.

CORRAO, S.; LO COCO, D.; LOPEZ, G. Cognitive impairment and stroke in elderly patients. **Vascular Health and Risk Management**, p. 105, 2016.

DA SILVA, A. B. et al. Agathisflavone, a flavonoid derived from *Poincianella pyramidalis* (Tul.), enhances neuronal population and protects against glutamate excitotoxicity. **NeuroToxicology**, v. 65, p. 85–97, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2018.02.001>>.

DE GROOT, H.; RAUEN, U. Ischemia-Reperfusion Injury: Processes in Pathogenetic Networks: A Review. **Transplantation Proceedings**, v. 39, n. 2, p. 481–484, 2007.

DI LEGGE, S. et al. Stroke prevention: Managing modifiable risk factors. **Stroke Research and Treatment**, v. 2012, 2012.

DIRNAGL, U.; IADECOLA, C.; MOSKOWITZ, M. A. Dirnagl_TrendsNeurosc 1999_Pathobiology of ischaemic stroke_review. **Trends Neurosci**, v. 22, p. 391–397, 1999.

DUARTE, J. C. et al. Preliminary Studies on the Analgesic Properties of the Ethanol Extract of *Combretum leprosum*. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 3, p. 213–215, 2003.

FACUNDO, V. A. et al. Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 2, p. 411–415, 1993.

FIGHERA, M. R. et al. Triterpene 3 β , 6 β , 16 β trihidroxilup-20(29)-ene protects against excitability and oxidative damage induced by pentylenetetrazol: The role of Na⁺,K⁺-ATPase activity. **Neuropharmacology**, v. 67, p. 455–464, 2012.

FISHER, M.; BASTAN, B. Identifying and utilizing the ischemic penumbra. **Neurology**, v. 79, n. 13 SUPPL. 1, 2012.

FU, Y. et al. Immune interventions in stroke. **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. 9, p. 524–535, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2015.144>>.

GAIRE, B. P. Herbal Medicine in Ischemic Stroke: Challenges and Prospective. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 24, n. 4, p. 243–246, 2018.

GARDONI, F.; DI LUCA, M. New targets for pharmacological intervention in the glutamatergic synapse. **European Journal of Pharmacology**, v. 545, n. 1, p. 2–10, 2006.

GO, A. S. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2013 Update. **Circulation**, v. 127, n. 1, p. e6–e245, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23239837>%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5408511%0Ahttps://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIR.0b013e31828124ad>.

GOEDERS, C. E. et al. Oxidative Stress in Ischemic Brain Damage: Mechanisms of Cell Death and Potential Molecular Targets for Neuroprotection. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 8, p. 1505–1517, 2010.

GRISAR, T.; GUILLAUME, D.; DELGADO-ESCUET, A. V. Contribution of Na⁺,K⁺-ATPase to focal epilepsy: a brief review. **Epilepsy Research**, v. 12, n. 2, p. 141–149, 1992.

GUPTA, A.; DAWSON, T. M. Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Blue Books of Neurology**, v. 34, n. C, p. 155–169, 2010.

HARUKUNI, I.; BHARDWAJ, A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia. **Neurologic Clinics**, v. 24, n. 1, p. 1–21, 2006.

HE, X. L. et al. Chrysin improves cognitive deficits and brain damage induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 680, n. 1–3, p. 41–48, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.01.025>>.

HUSSAIN, G. et al. Role of plant-derived flavonoids and their mechanism in attenuation of Alzheimer's and Parkinson's diseases: An update of recent data. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 1–26, 2018.

JACKSON, J. C. et al. Cognitive and physical rehabilitation of intensive care unit survivors: Results of the RETURN randomized controlled pilot investigation. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 4, p. 1088–1097, 2012.

JICKLING, G. C. et al. Targeting neutrophils in ischemic stroke: Translational insights

from experimental studies. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 35, n. 6, p. 888–901, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2015.45>>.

JOHNSON, W. et al. Stroke: a global response is needed. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 9, p. 634–634A, 2016.

KALOGERIS, T. et al. **Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury**. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2012. v. 298. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>>.

KHOSHNAMEH, S. E. et al. Memory deficits and hippocampal inflammation in cerebral hypoperfusion and reperfusion in male rats: Neuroprotective role of vanillic acid. **Life Sciences**, v. 211, p. 126–132, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.08.065>>.

KIM, E.; CHO, S. Microglia and Monocyte-Derived Macrophages in Stroke. **Neurotherapeutics**, v. 13, n. 4, p. 702–718, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s13311-016-0463-1>>.

KNUTTINEN, M. G. et al. Review of pharmacology and physiology in thrombolysis interventions. **Seminars in Interventional Radiology**, v. 27, n. 4, p. 374–383, 2010.

KUNLE. Standardization of herbal medicines - A review. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 4, n. 3, p. 101–112, 2012.

KURODA, R. et al. Cholinergic deafferentation after focal cerebral infarct in rats. **Stroke**, v. 22, n. 10, p. 1291–1296, 2011.

LACKLAND, D. T. et al. Inclusion of stroke in cardiovascular risk prediction instruments: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. **Stroke**, v. 43, n. 7, p. 1998–2027, 2012.

LEE, J. H.; ZHANG, J.; YU, S. P. Neuroprotective mechanisms and translational potential of therapeutic hypothermia in the treatment of ischemic stroke. **Neural Regeneration Research**, v. 12, n. 3, p. 341–350, 2017.

LEVINE, D. A.; LANGA, K. M. Vascular Cognitive Impairment: Disease Mechanisms and Therapeutic Implications. **Neurotherapeutics**, v. 8, n. 3, p. 361–373, 2011.

LEWERENZ, J.; MAHER, P. Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases-What is the evidence? **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. DEC, p. 1–20, 2015.

LI, C. et al. Effects of Panax notoginseng ginsenoside Rb1 on abnormal hippocampal microenvironment in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 202, n. September

2016, p. 138–146, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.005>>.

LINDLEY, R. L. et al. Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 379, n. 9834, p. 2364–2372, 2012. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60738-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60738-7)>.

MAGI, S.; PICCIRILLO, S.; AMOROSO, S. The dual face of glutamate: from a neurotoxin to a potential survival factor—metabolic implications in health and disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00018-018-3002-x>>.

MALOUF, R.; BIRKS, J. Donepezil for vascular cognitive impairment. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, 2004.

MATSUMOTO, S. et al. Edaravone and cyclosporine A as neuroprotective agents for acute ischemic stroke. **Acute Medicine & Surgery**, v. 5, n. 3, p. 213–221, 2018.

MEDEROS, S.; GONZÁLEZ-ARIAS, C.; PEREA, G. Astrocyte–Neuron Networks: A Multilane Highway of Signaling for Homeostatic Brain Function. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 10, n. November, p. 1–12, 2018.

MICIELI, G.; PIERA, S. M.; TOSI, A. Vascular Health and Risk Management Safety and efficacy of alteplase in the treatment of acute ischemic stroke. **Vascular Health and Risk Management**, v. 5, p. 397–409, 2009. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.778.5819&rep=rep1&type=pdf>>.

MORAES, L. S. et al. Medicinal plant Combretum leprosum mart ameliorates motor, biochemical and molecular alterations in a Parkinson's disease model induced by MPTP. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 185, p. 68–76, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.03.041>>.

MORIZAWA, Y. M. et al. Reactive astrocytes function as phagocytes after brain ischemia via ABCA1-mediated pathway. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00037-1>>.

MORRISON, H.; MCKEE, D.; RITTER, L. Systemic Neutrophil Activation in a Mouse Model of Ischemic Stroke and Reperfusion. **Biological Research for Nursing**, v. 13, n. 2, p. 154–163, 2011.

NAGANUMA, M. et al. Associations between Uric Acid Level and 3-Month Functional

Outcome in Acute Ischemic Stroke Patients Treated with/without Edaravone. **Cerebrovascular Diseases**, v. 45, n. 3–4, p. 115–123, 2018.

NELL, H. J. et al. Motor and Hippocampal Dependent Spatial Learning and Reference Memory Assessment in a Transgenic Rat Model of Alzheimer's Disease with Stroke. **Journal of Visualized Experiments**, n. 109, p. 1–11, 2016.

NETO, R. L. S.; CORDEIRO, L. S.; LOIOLA, M. I. B. Flora do Ceará, Brasil: Combretaceae. **Rodriguesia**, v. 65, n. 3, p. 685–700, 2014.

NOUR, M.; SCALZO, F.; LIEBESKIND, D. S. Ischemia-Reperfusion Injury in Stroke. **Interventional Neurology**, v. 1, n. 3–4, p. 185–199, 2013.

NYS, G. M. S. et al. Cognitive and functional outcome after intravenous recombinant tissue plasminogen activator treatment in patients with a first symptomatic brain infarct. **Journal of Neurology**, v. 253, n. 2, p. 237–241, 2006.

OHAB, J. J. et al. A Neurovascular Niche for Neurogenesis after Stroke. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 50, p. 13007–13016, 2006.

PEDROSO, V. et al. Early psychiatric morbidity in a Brazilian sample of acute ischemic stroke patients. **Clinics**, v. 73, p. 1–5, 2018.

PIETROVSKI, E. F. et al. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxiup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, n. 1, p. 90–99, 2006.

RUHNAU, J. et al. Thrombosis, Neuroinflammation, and Poststroke Infection: The Multifaceted Role of Neutrophils in Stroke. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, p. 1–7, 2017.

SHINODA, N. et al. Prediction of hemorrhagic transformation after acute thrombolysis following major artery occlusion using relative ADC ratio: A retrospective study. **Journal of Neuroradiology**, v. 44, n. 6, p. 361–366, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurad.2017.07.003>>.

SHINODA, Y. et al. Low doses of the mycotoxin citrinin protect cortical neurons against glutamate-induced excitotoxicity. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 41, n. 2, p. 311–319, 2016.

SINGH, V. et al. Amelioration of ischemia-reperfusion induced functional and biochemical deficit in mice by *Ocimum kilimandscharicum* leaf extract. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 85, p. 556–563, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.064>>.

SOLEY, B. da S. et al. Combretum leprosum Mart. (Combretaceae): Potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 311–319, 2012.

SUN, J.-H.; TAN, L.; YU, J.-T. Post-stroke cognitive impairment: epidemiology, mechanisms and management. **Annals of translational medicine**, v. 2, n. 8, p. 80, 2014. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25333055>%0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4200648>>.

TSATSOS, M. et al. Phytotherapy and intraoperative floppy iris syndrome: The implications. **Eye (Basingstoke)**, v. 31, n. 6, p. 823–826, 2017.

VIEIRA JÚNIOR, G. M. et al. Antinociceptive effect on mice of the hydroalcoholic fraction and (-) epicatechin obtained from Combretum leprosum Mart & Eich.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 43, n. 12, p. 1184–1192, 2010.

W.-D., H. Ischemic penumbra: Evidence from functional imaging in man. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 20, n. 9, p. 1276–1293, 2000. Disponível em:

<<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed5&NEWS=N&AN=2000314358>>.

WANG, Y. H. et al. Xiao-Xu-Ming decoction extract regulates differentially expressed proteins in the hippocampus after chronic cerebral hypoperfusion. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 3, p. 470–479, 2019.

WIDMANN, C. et al. The Traditional Chinese Medicine MLC901 inhibits inflammation processes after focal cerebral ischemia. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-36138-0>>.

YAMAGUCHI, T. et al. Edaravone with and without 6 Mg/Kg Alteplase within 4.5 Hours after Ischemic Stroke: A Prospective Cohort Study (PROTECT4.5). **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 26, n. 4, p. 756–765, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.10.011>>.

YUAN, J. et al. Curcumin inhibits glial scar formation by suppressing astrocyte-induced inflammation and fibrosis in vitro and in vivo. **Brain Research**, v. 1655, p. 90–103, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2016.11.002>>.

